

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2003-524028
(P2003-524028A)

(43)公表日 平成15年8月12日 (2003.8.12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 0 8 G 65/333		C 0 8 G 65/333	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/77		A 6 1 K 31/77	4 C 0 8 6
47/48		47/48	4 J 0 0 5
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	
35/02		35/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 35 頁) 最終頁に続く

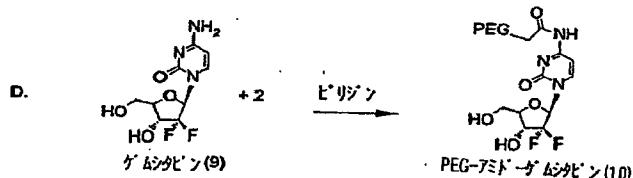
(21)出願番号	特願2001-524562(P2001-524562)
(86) (22)出願日	平成12年9月21日 (2000.9.21)
(85)翻訳文提出日	平成14年3月25日 (2002.3.25)
(86)国際出願番号	PCT/US00/25895
(87)国際公開番号	WO01/021135
(87)国際公開日	平成13年3月29日 (2001.3.29)
(31)優先権主張番号	09/404,075
(32)優先日	平成11年9月23日 (1999.9.23)
(33)優先権主張国	米国 (U.S.)

(71)出願人	エンソゾン、インコーポレーテッド アメリカ合衆国 08854-3998 ニュージ ヤージー州、ピスカタウェイ、キングスブ リッジ ロード 20番地
(72)発明者	グリーンウォルド、リチャード、ビイ. アメリカ合衆国 08873 ニュージャージ ー州 ソマーセット、ヒッコリー ロード 113
(72)発明者	チョ、ウン ファン アメリカ合衆国 08854 ニュージャージ ー州 ピスカタウェイ、ゲンマ コート 2
(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名)
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 a r a - C 及び a r a - C 誘導体のポリマーコンジュゲート

(57)【要約】

本発明は、式(I) [式中、Gは直鎖又は分枝鎖の末端官能基化ポリマー残基であり、Y₁は0、S又はNR₁であり、MはX又はQであり、Xは電子吸引基であり、QはC(=Y₁)から3～6番目の原子に位置する自由電子対を含有する部分構造であり、Bは(1)又は(2)であり、R₁～₅は独立して水素、C₁～₆アルキル、C₃～₁₂分枝鎖アルキル、C₃～₈シクロアルキル、C₁～₆置換アルキル、C₃～₈置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、C₁～₆ヘテロアルキル及び置換C₁～₆ヘテロアルキルより成る群から選択され、R₆はOR₇ (ここで、R₇はR₁～₅が表す置換基と同じ置換基の群から選択される)であるか又はN₃、N₄、NO₂若しくはCN⁺であり、R₈～₁₀は独立して水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素又はR₆から選択され、a及びnは各々独立してゼロ又は正の整数である]で表されるポリマープロドラッグ生体内輸送形態に関する。本明細書に開示されているポリマープロドラッグ生体内輸送形態の形成方法及びそれを用いる治療方法も開示される。

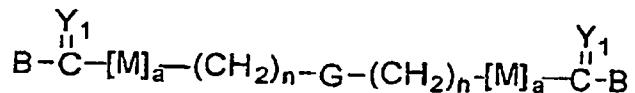


【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(I)：

【化1】

(I)



[式中、

Gは、直鎖又は分枝鎖の、末端官能基化ポリマー残基であり、

Y₁は、O、S、又はNR₁であり、

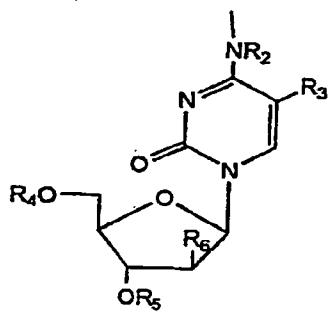
Mは、X、又はQであり、

Xは電子吸引基であり、

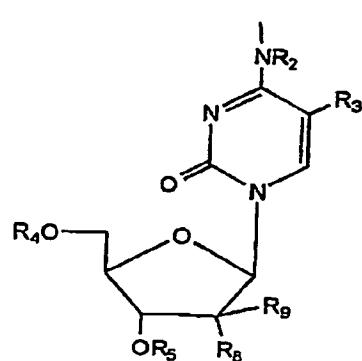
Qは、C(=Y₁)から3～6番目の原子に位置する自由電子対を含有する部分構造であり、

Bは、

【化2】



または



であり、

R₁～₅は、独立して、水素、C₁～₆アルキル、C₃～₁₂分枝鎖アルキル、C₃～₈シクロアルキル、C₁～₆置換アルキル、C₃～₈置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、C₁～₆ヘテロアルキル、及び置換C₁～₆ヘテロアルキルより成る群から選択され、

R_6 は、 $O R$ 、（ここで、 R 、は $R_1 \sim 5$ が表す置換基と同じ置換基の群から選択される）であるか、又は、 N_3 、 NH_2 、 NO_2 、若しくは CN であり、

$R_{\text{B}} \sim \text{,}$ は、独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、又は R_{B} から選択され、

a 及び n は、各々独立してゼロ又は正の整数である]

で表される化合物。

【請求項 2】 Y_1 が酸素である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】 n が、0、1、又は2である、請求項1に記載の化合物。

【請求項 4】 n がゼロである、請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 5】 n が 1 である、請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 6】 n が 2 である、請求項 3 に記載の化合物。

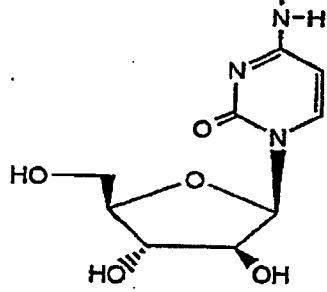
【請求項 7】 a がゼロである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 8】 a が 1 である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 9】 M が NH である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 10】 a 及び n が共にゼロである、請求項 1 に記

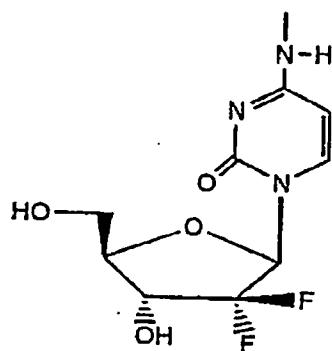
【請求項11】 Bが



である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 1 2】 B が

【化 4】



である、請求項1に記載の化合物。

【請求項13】 Gが、

$O-(CH_2-CH_2-O)_x$ 、又は $O-(CH(CH_3)CH_2-O)_x$

であって、xは重合度である、請求項1に記載の化合物。

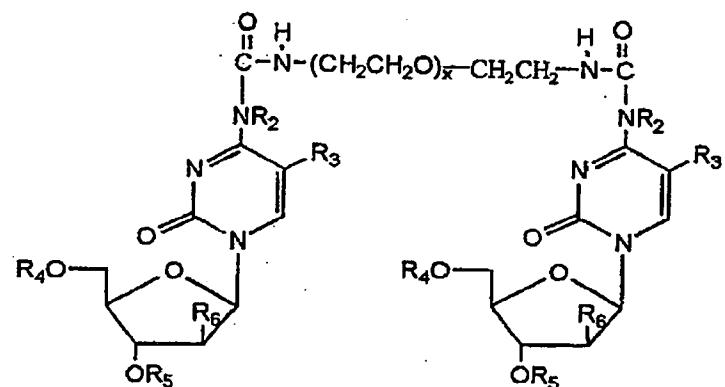
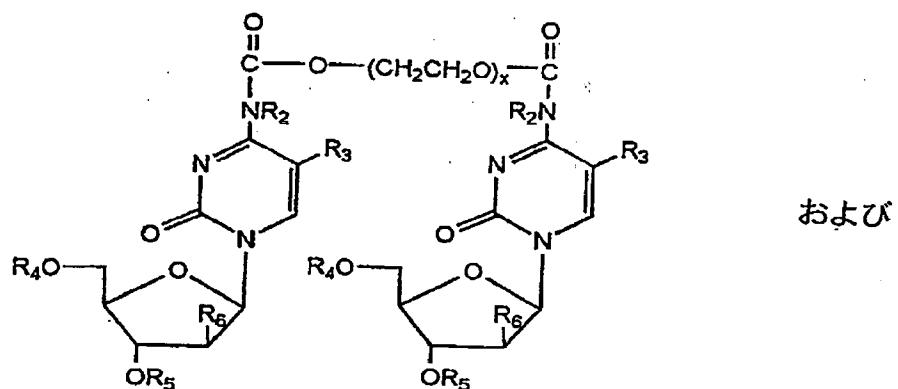
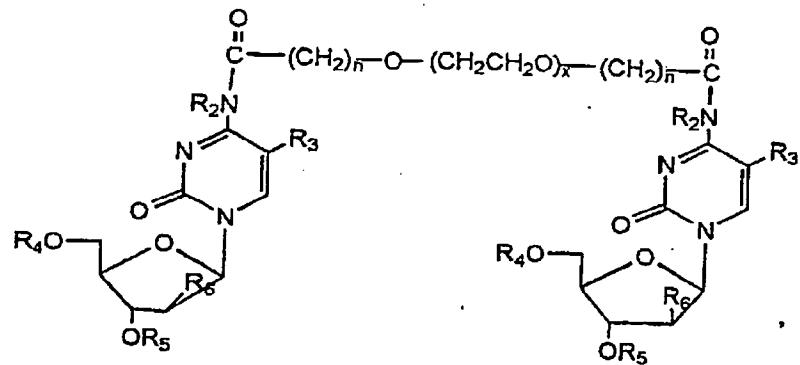
【請求項14】 Gが $O-(CH_2-CH_2-O)_x$ であって、xは数平均分子量が少なくとも約20,000ダルトンと成るように選択される正の整数である、請求項13に記載の化合物。

【請求項15】 Gの数平均分子量が約20,000ダルトン～約100,000ダルトンである、請求項13に記載の化合物。

【請求項16】 Gの数平均分子量が約25,000ダルトン～約60,000ダルトンである、請求項15に記載の化合物。

【請求項17】 下記

【化5】

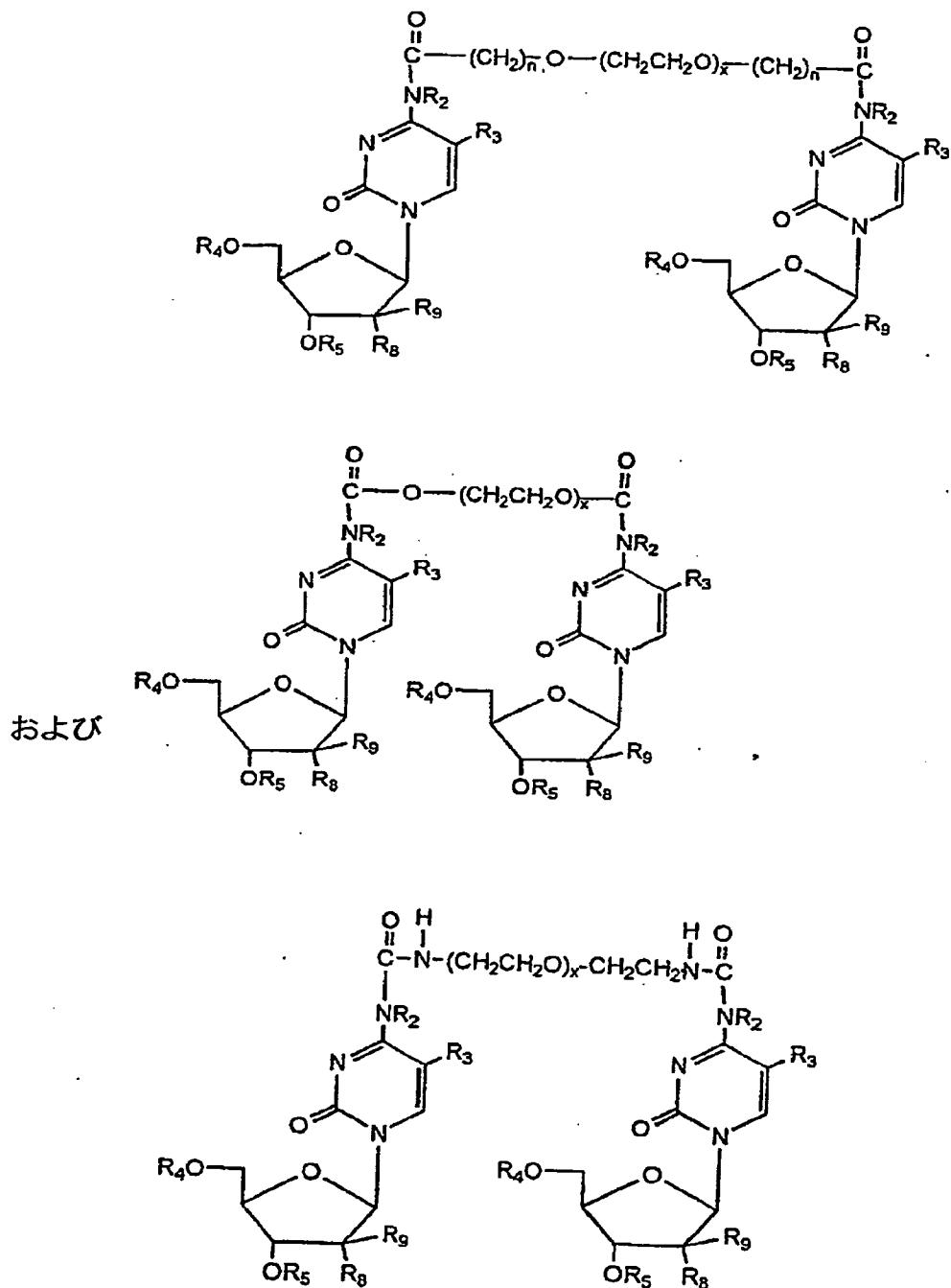


[上記式中、xは重合度を表す]

より成る群から選択される、請求項1に記載の化合物。

【請求項18】 下記

【化6】



[上記式中、 x は重合度を表す]

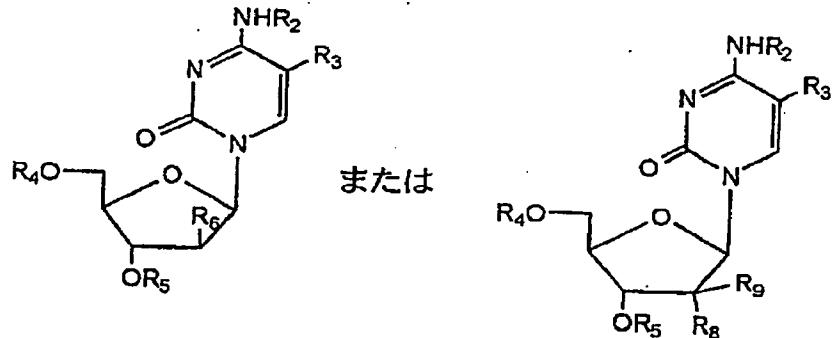
より成る群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 19】 有効量の請求項 1 に記載の化合物を投与することを含んで成る、哺乳動物の治療方法。

【請求項 20】 ポリマーコンジュゲートの製造方法であって、

下記

【化7】



[上記式中、

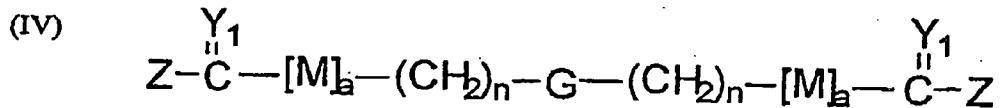
$R_2 \sim 5$ は、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_3 \sim 12$ 分枝鎖アルキル、 $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、 $C_1 \sim 6$ 置換アルキル、 $C_3 \sim 8$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_1 \sim 6$ ヘテロアルキル、及び置換 $C_1 \sim 6$ ヘテロアルキルより成る群から選択され、

R_6 は、 OR_7 （ここで、 R_7 は $R_1 \sim 6$ が表す置換基と同じ置換基の群から選択される）であるか、又は、 N_3 、 NH_2 、 NO_2 、若しくは CN であり、

$R_8 \sim 9$ は、独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、又は R_6 から選択される]

より成る群から選択される化合物を、式(IV)：

【化8】



[式中、

G は、直鎖又は分枝鎖の、末端官能基化ポリマー残基であり、

Y_1 は、 O 、 S 、又は NR_1 であり、

M は、 X 、又は Q であり、

X は電子吸引基であり、

Q は、 C (= Y₁) から 3 ~ 6 番目の原子に位置する自由電子対を含有する部分構造であり、

Z は脱離基であり、

a 及び n は、各々独立してゼロ又は正の整数である]

で表される 2 つの末端が活性化されたポリマーと反応させてポリマーコンジュゲートを形成させることを含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、代謝拮抗剤ポリマーコンジュゲートに関する。より詳細には、本発明は、ara-C、ゲムシタビン(gemcitabine)及びそれらの誘導体のポリマーコンジュゲート並びにその製造方法に関する。

【0002】

発明の背景

ピリミジンヌクレオチド類似体であるara-C(シトシンアラビノース、シタラビン(cytarabine)、1-(β-D-アラビノフラノシル)シトシン)は、主として急性骨髄性白血病及び幾つかの他のタイプの非固形腫瘍の治療において使用されている効果的な抗癌剤である。ara-Cの主な利点の1つは、細胞がG期からS期へ移行するのを妨げる能力である。しかしながら、ara-Cはその分子構造に関連した欠点も有する。例えば、ara-Cは、血漿中に於いてデオキシシチジンデアミナーゼにより急速に脱アミノ化されて不活性なara-Uを形成する。また、ara-Cを使用した場合、耐性が発達すると共に、ara-Cが体内に多量に蓄積して重い毒性の副作用を引き起こす。さらに、ara-Cは固形腫瘍に対しては治療効果がないと一般に信じられている。

【0003】

ara-Cの欠点に関する取り組みの1つは、ara-Cをテトラヒドロウリジン等のデアミナーゼ阻害剤と一緒に投与することであった。他の試みは、例えばara-Cの2位を修飾することによる、脱アミノ化の制御に集中した。また、ara-Cのプロドラッグを作るという提案も多く成された。例えば、ara-Cの可能なプロドラッグとして、様々な、N'-アシル誘導体、5'-アシル誘導体及び3'-アシル誘導体が提案されてきた。

【0004】

プロドラッグは生物学的に活性な親化合物の化学的誘導体であって、投与するとin vivoで最終的に該親化合物を遊離させる化学的誘導体を包含する。プロドラッグを用いて、当業者は、in vivoにおける薬剤の作用の発現時期や持続時間

を調節することができ、また、薬剤を投与された患者の体内での薬剤の輸送や、分布又は溶解度を調節することができる。プロドラッグの典型的な例としては、アルコール類やチオアルコール類（チオール類）の有機リン酸エステルやエスチル類を挙げることができる。

【 0 0 0 5 】

ara-Cのプロドラッグの1つの型は、N⁴-ペプチジル誘導体をベースとするものである。例えば、F. M. Mengerら、Bioconjugate Chem. 5, 162 (1994) ; Wipf, P. ら、Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol. 4, No. 10, pp 1585-1596 (1996) ; 及びBalajthy ら、J. Med. Chem. 35, pp. 3344-3349 (1992) を参照されたい。同様に、米国特許第5,641,758号にはN⁴-オクタデシルara-C誘導体が開示され、これは、同特許によれば酵素による脱アミノ化に対する耐性が向上している。N⁴-オクタデシルプロドラッグはin vivoでara-Cを遊離させるが、その体内循環寿命（circulating life）や固体腫瘍に対する活性を増強することができれば有益であろう。

【 0 0 0 6 】

ポリマーコンジュゲーションは、薬剤親化合物の薬物動力学的特性及び薬理学的特性を向上させる手段であることが示唆されている。例えば、Greenwaldらの米国特許第5,880,131号には、エステルをベースにポリマーを結合させて一時的に薬剤親化合物の体内循環寿命を延ばすことが開示されている。該特許の内容は、参照により本明細書に組み入れる。ポリマーと親化合物残基の間の、加水分解に対して比較的耐性を示す結合に関しては開示されていない。

【 0 0 0 7 】

これまでにも何種類かのポリマー-ara-Cコンジュゲートは報告されているが、それらには、1つ又はそれ以上の欠点があると思われる。ara-Cのポリマー性薬剤を合成するための1つのアプローチは、J. Cancer Research 44, 25-30, Jan. (1984) に記載されている。前記論文の著者は、ポリグルタミン酸（PLGA）又は関連するコポリマー（PHEG）をアミド結合を介してara-CのN⁴位に結合させた。しかしながら、該コポリマーのペンドント基へ結合するara-Cの量は予測できず、単に推定することができるのみである。該コポ

リマー上に結合した a r a - C 分子の位置も不規則である。従って、 a r a - C がこれらポリマーから加水分解される速度が予測できず、該ポリマーから遊離される a r a - C の量も変動し得るということは、驚くべきことではない。また、前記著者は、 a r a - C に比較してこれらの化合物が L 1 2 1 0 (白血病) 細胞系に対して優れた *in vitro* 活性を示すことを報告しているが、これらの化合物の 固形腫瘍に対する有効性に関しては、何の活性も報告されていない。

【 0 0 0 8 】

a r a - C のプロドラッグを形成する別のアプローチは、 Drug Design and Discovery, 1993, Vol. 10, pp. 343-353 の中で Ichikawa, H. らによって報告されている。この報告では、キトサン（繰り返しペンドント基を有する生物分解性ポリマー）を無水グルタル酸スペーサーを介して a r a - C に結合させている。しかしながら、この反応は収率が低く、上記した a r a - C の P L G A 及び P H E G コンジュゲートと同様、キトサン-スペーサー- a r a - C コンジュゲートは、 a r a - C のペンドント基への結合やその後の加水分解について予測不能である。

【 0 0 0 9 】

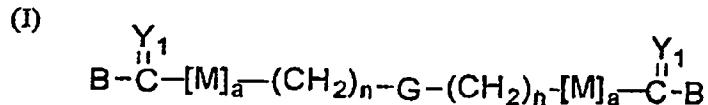
従って、 a r a - C について既に改善が成されているにもかかわらず、更なる改善についての継続的なニーズが存在している。本発明は、このニーズを扱うものである。

【 0 0 1 0 】

発明の概要

本発明の 1 つの態様は、式 (I) :

【 化 9 】



[式中、

G は、直鎖又は分枝鎖の、末端官能基化ポリマー残基であり、

Y_1 は、 O 、 S 、 又は NR_1 であり、

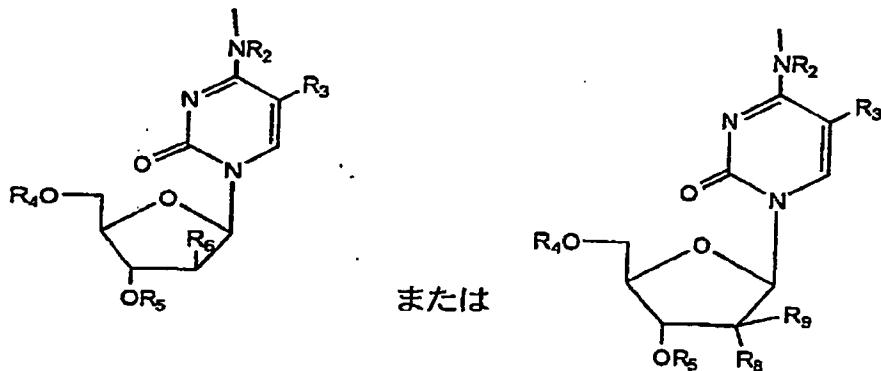
M は、 X 、 又は Q であり、

X は電子吸引基であり、

Q は、 C ($= Y_1$) から 3 ~ 6 番目の原子に位置する自由電子対を含有する部分構造であり、

B は、

【化10】



であり、

$R_1 \sim 5$ は、 独立して、 水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_3 \sim 12$ 分枝鎖アルキル、 $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、 $C_1 \sim 6$ 置換アルキル、 $C_3 \sim 8$ 置換シクロアルキル、 アリール、 置換アリール、 アラルキル、 $C_1 \sim 6$ ヘテロアルキル、 及び置換 $C_1 \sim 6$ ヘテロアルキルより成る群から選択され、

R_6 は、 OR_7 (ここで、 R_7 は $R_1 \sim 5$ が表す置換基と同じ置換基の群から選択される) であるか、 又は、 N_3 、 NH_2 、 NO_2 、 若しくは CN であり、

$R_8 \sim 9$ は、 独立して、 水素、 フッ素、 塩素、 臭素、 ヨウ素、 又は R_6 から選択され、

a 及び n は、 各々独立してゼロ又は正の整数、 好ましくは約 1 ~ 約 5 である] で表される化合物を提供することである。

【0011】

好ましい実施形態では、 Y_1 は O であり、 G はポリ(エチレングリコール)残基であり、 M は NH 又は酸素である。

【0012】

本発明に於いては、用語「残基」は、生物学的に活性な化合物がプロドラッグ担体部分が結合する置換反応を受けた後にも残存している、生物学的に活性な化合物の部分を意味すると解される。

【0013】

本発明に於いては、用語「アルキル」は、直鎖若しくは分枝鎖の置換C₁～C₂アルキル、例えば、ハロー、アルコキシ-若しくはニトロ-C₁～C₂アルキル、C₃～C₈シクロアルキル、又は置換されたC₃～C₈シクロアルキル等を包含するものと解される。

【0014】

本発明に於いては、用語「置換（置換された）」は、化合物の官能基に含まれる1つ以上の原子を1つ以上の別の原子で置き換えるか又は別の原子を付け加えることを包含するものと解される。本発明に於いて、用語「有効量」は、治療効果を達成する量を意味するものであり、「効果」の意味するところは当業者には理解される。

【0015】

本発明のポリマーコンジュゲートの主な利点の1つは、ara-C残基がポリマーの末端部にのみ存在することである。即ち、一様なポリマーコンジュゲートは分析も容易であり、再現性もよい。加水分解速度も予測可能であり、バッチ間での再現性がよい。また、更に有利な点は、ポリマー部分の分子量が約20kDa～約50kDaである好ましい実施形態に於いて、本発明のコンジュゲートは受動的に腫瘍を標的とし、それによってara-C及び関連化合物の固形腫瘍に対する効果を増強すると考えられる点である。理論に拘束されるものではないが、腫瘍のプロテアーゼ単独で、及び／又は腫瘍のプロテアーゼとペプチダーゼが一緒になって、芳香族アミド若しくはカルバメート結合を切断して、それによって腫瘍内で活性な親化合物を遊離させると考えられる。本明細書中に記載された化合物及びコンジュゲートの製造方法及び使用方法も提供される。

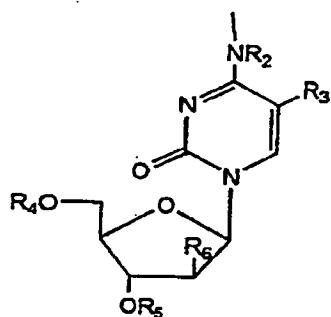
【0016】

発明の説明

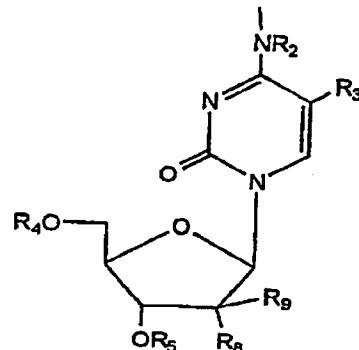
A. a r a - C 誘導体

式(I)において、Bは、

【化11】

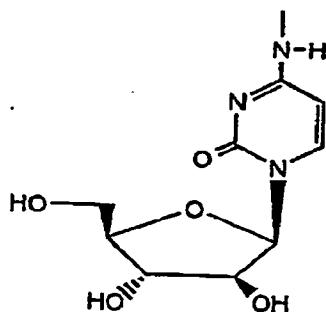


または



[上記式中、全ての可変部分は上記「発明の概要」で定義した通りである]のいずれかである。幾つかの好ましい実施形態では、Bはa r a - C残基であって、上記式に於いては、R₂ ~ sが各々水素であり、R₆がO R₇であり、R₇も水素である。a r a - C残基は、構造式：

【化12】

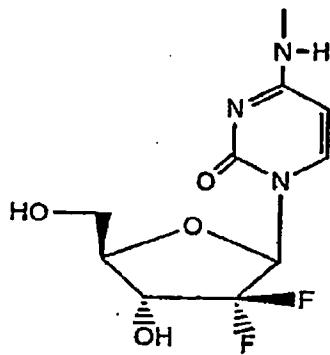


で表される。

【0017】

別の好ましい実施形態では、Bはゲムシタピン残基であって、上記式に於いては、R₂ ~ sが各々水素であり、R₈及びR₉が各々フッ素である。ゲムシタピン残基は、構造式：

【化13】



で表される。

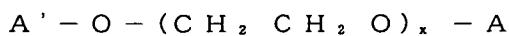
【0018】

本発明の別の態様では、Bは、Wipf, P.ら, "Prodrugs of ara-C", Drugs of the Future (1994) 19 (1), 49-54に記載されているようなara-C誘導体の残基である。前記文献の内容は参照により本明細書に組み入れる。例えば、Bは、5'-若しくは3'-アシルara-C誘導体残基、シクロシチジン残基、又は2'-デオキシシチジン誘導体残基であり得る。本発明の目的のためには、ara-C部分の残基がそのN⁴置換基を介して共有結合するように設計されることは当業者には理解される。さらに、本明細書に於いて具体的に言及されているara-C誘導体のみではなく、N⁴においてポリマー置換反応を受けることが可能な別の任意のara-C誘導体も本発明に包含されることは、当業者には理解される。

【0019】

B. 実質的に非抗原性であるポリマー

式(I)において、Gは直鎖又は分枝鎖の末端官能基化ポリマー残基であって、好ましくは実質的に非抗原性である。本発明の好ましい態様では、該ポリマー残基はポリ(エチレングリコール)(PEG)等のポリアルキレンオキシドをベースとするものである。PEG及びその誘導体は、式:



で表される。ここで、xは重合度(即ち、約10~約2,300)、即ち、ポリマー鎖中の反復単位の数を表して、ポリマーの分子量に依存し、AはH又はキャッピング基、例えば、アミノアルキル、カルボキシアルキル、ハロアルキル、若

しくは他の活性化基を表し、A'はAと同一であるか、又はAの別の基を表す。

別の態様では、ポリマー残基はポリ(プロピレングリコール)(PPG)である。

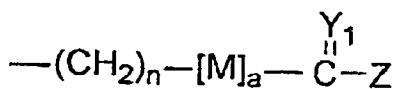
従つて、G部分の残基は好ましくは $O - (CH_2 CH_2 O)_x$ 、又は $O - (CH(CH_3)_2 CH_2 O)_x$ [式中、xは重合度を表す]である。本発明の譲受人に譲渡された米国特許第5,643,575号に記載されているような分枝鎖PEG誘導体や、Shearwater Polymers, Inc. カタログ"Polyethylene Glycol Derivatives 1997-1998"に記載されているような「星型PEG(star-PEG)」及びマルチアームPEGも有用である。前記特許及びカタログの記載内容は、参照により本明細書に組み入れる。

【0020】

PAOをベースとする好ましいポリマーの代替えとして、他の実際的に非抗原性の末端官能基化ポリマー、例えば、デキストラン、ポリビニルアルコール等も、PEG等のPAO類に関して本明細書中に記載されているのと同じ型の活性化を採用する場合は、使用することができる。当業者であれば、上記したポリマーのリストは単に例示であって、本明細書中に記載されている性質を有する全てのポリマー物質が意図されていることを理解し得る。本発明に於いては、用語「実際的に非抗原性」及び「実質的に非抗原性」は、実質的に非毒性であって哺乳動物において感知し得る免疫応答を誘発しないことが当業界で知られている全てのポリマー物質を包含すると解される。当業者であれば、ara-C誘導体のNH基への結合を容易にするための所望のスペーサー直鎖状部分構造及び脱離基を付け加えるために、水溶性ポリマー、例えば、PEGの末端を文献に報告されている標準的な有機合成技術を用いて官能基化できることを理解する。あるいは、官能基化PEGは、アラバマ州ハンツビルのShearwater Polymersや、ウィスconsin州ミルウォーキーのAldrich Chemical Company等の供給業者から市販されているものを用いることもできる。PEGはその末端を修飾して、下記式(I)：

【化14】

(II)



で表される部分構造を有するようにすることができる。前記式中、Z以外の全ての可変部分は上記の通りであり、Zは脱離基、例えば、p-ニトロフェニル若しくはスクシンイミジルカーボネートのような活性化されたカーボネート構造、チアゾリジンチオン、又は保護されていないアミンと反応し得る当業者に知られた他の活性化基である。合成の最後のステップに於いて、a r a - C部分はポリマーと反応してコンジュゲートを形成する。

【0021】

所望の結合を形成するために、活性化されたポリマー、例えば、PEG二酸や、PEGジアミン及びPEGジオール等を用いることができる。適するPAO酸は、先ず、PEG-OHをエチルエステルに変換した後、ケン化処理することにより合成することができる。Gehrhardt, H.ら, Polymer Bulletin 18: 487 (1987) 及びVeronese, F. M.ら, J. Controlled Release 10: 145 (1989) も参照されたい。あるいは、PAO酸は、PEG-OHをt-ブチルエステルに変換した後酸開裂させて合成することもできる。例えば、本発明の譲受人に譲渡された米国特許第5,605,976号を参照されたい。上記文献及び特許の内容は参考により本明細書に組み入れる。PAO及びPEGの数平均分子量は実質的に様々の値をとることができが、本発明の目的の為には、通常、約2,000～約10,000の範囲のポリマーを選択する。分子量としては、約5,000～約80,000が好ましく、約20,000～約50,000が特に好ましい。本発明のプロドラッグに含ませるポリマーの数平均分子量は、該プロドラッグが、その連結基の加水分解前に充分に体内を循環できるように、充分な値でなければならぬ。好ましくは、GがO-(CH₂CH₂O)_xであり、xが、数平均分子量が少なくとも約20,000ダルトンに成るように選択される正の整数である。

【0022】

C. 連結部分

1. M 基

式(1)において、Mは、X又はQであって、X及びQは、電子吸引基を表す可変部分である。特に、X及びQは独立して、O、S又はNR₁。等から選択され、その際R₁。は、多少例を挙げれば、水素、C₁～₆アルキル、C₃～₁₂分枝鎖アルキル、C₃～₈シクロアルキル、C₁～₆置換アルキル、C₃～₈置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、C₁～₆ヘテロアルキル及び置換C₁～₆ヘテロアルキル、分枝した、アルキル、アリール、置換アリール、C₁～₆アルキルアラルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、又は置換C₁～₆アルキル、例えば、カルボキシアルキル、アミノアルキル、ジアルキルアミノ、ヒドロキシアルキル又はメルカプトアルキルの1つである。好ましくは、XはO又はNR₁。であり、R₁。は好ましくはHである。

【0023】

2. 連結基のQ部分

MがQである場合、ポリマー残基Gは、好ましくは酸素などのヘテロ原子を介してQに結合する。Qは、C(=Y₁)から3～6番目の原子に位置する自由電子対を含有する部分構造である。好ましい実施形態に於いては、自由電子対はC(=Y₁)から5番目の原子に存在する。Qは、O、S又はNR₁。 (ここで、R₁。は、R₁。に関して上記で挙げられた基と同じ基として定義される)で置換された、シクロアルキル、アリール及びアラルキル基より成る群から選択することができるが、それらに限定されない。R¹。は、好ましくは、H、C₁～₆アルキル、又は置換C₁～₆アルキルである。自由電子対は、自由電子対とC(=Y₁)の間が所定の間隔に維持されている限りに於いて、Q部分構造の何れの場所に存在していてもよい。自由電子対は、好ましくはエステル結合の加水分解に際して、3員～6員の、好ましくは5員の環中間体を形成し得るので、Qは、アンキメリックアシスタンスによりプロドラッグの結合の加水分解を促進する。

【0024】

D. ポリマープロドラッグ輸送系の合成

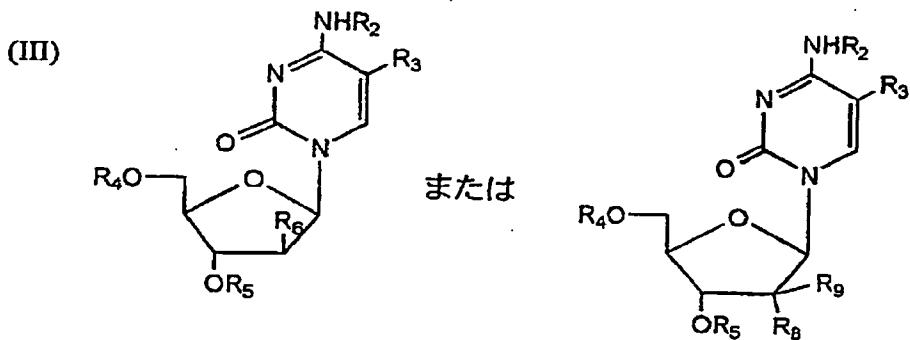
本発明のプロドラッグは、標準的な有機合成技術を用いて合成することができる。必要な場合には、ポリマーにスペーサーを付けて、該スペーサーを末端脱離

基を結合させることで活性化する。活性化されたポリマー部分は、商業的製造元から入手することができるか、又は当業者が過度の実験を行うことなく合成することができる。例えば、PEG二酸は、アラバマ州ハンツビルのShearwater Polymersや、ウィスコンシン州ミルウォーキーのAldrich Chemical Companyから市販されているものを用いることができる。それらは、本発明の譲受人に譲渡された米国特許第5,605,976号に記載されているように合成することもできる。前記特許の内容は、参考により本明細書に組み入れる。アミド結合を得ようとする場合は、本発明の譲受人に譲渡された米国特許第5,349,001号に記載されているようなビスチアゾリジン-2-チオンで活性化したPEG(T-PEG)等の活性化されたPEGを用いることができる。あるいは、カルバメート結合を得ようとする場合は、本発明の譲受人に譲渡された米国特許第5,122,614号に記載されているように製造されたPEG-ジークロロホルメート若しくはビス-SC-PEG等の適切に活性化されたPEG、又はビス-p-ニトロフェニルクロロホルメートで活性化されたPEGを用いることができる。前記した2つの米国特許の各々の開示内容は、参考により本明細書に組み入れる。尿素が結合したara-Cは、ビス-PEG-NH₂をホスゲン若しくはトリホスゲン及びジイソプロピルエチルアミン(DIEA)等の第三級塩基と反応させて得られるビス-PEG-イソシアネートを用いて製造することができる。入手元によらず、得られた活性化ポリマーを次いでara-C誘導体と反応させてコンジュゲートを形成させる。

【 0025 】

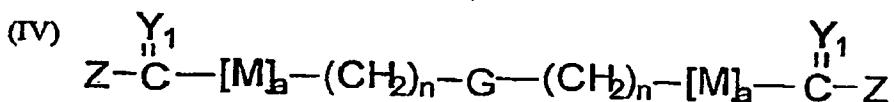
上記製造方法を例示すれば、該方法は、式(III)：

【 化15 】



で表される化合物を、式(IV)：

【化16】



で表される2つの末端が活性化されたポリマーと反応させて式(I)の化合物を形成させることを包含する。この反応に関連した反応図式を示す図1及び2も参考されたい。

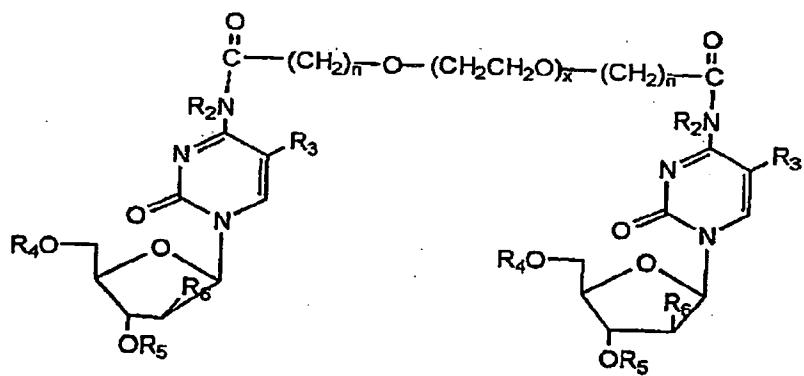
【0026】

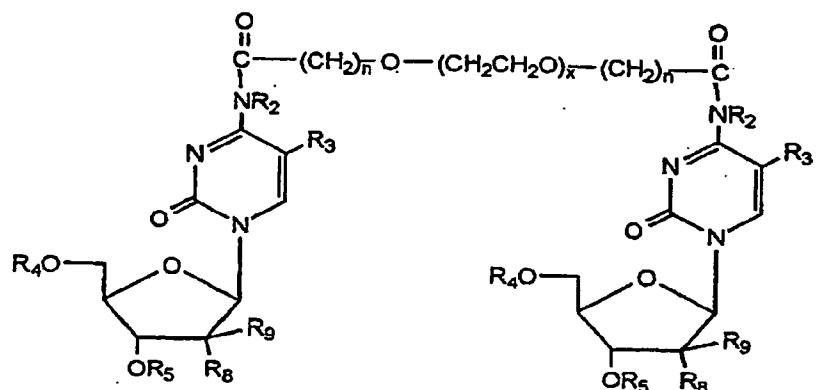
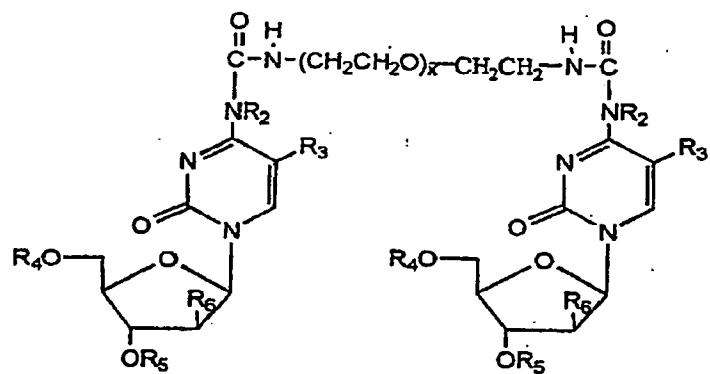
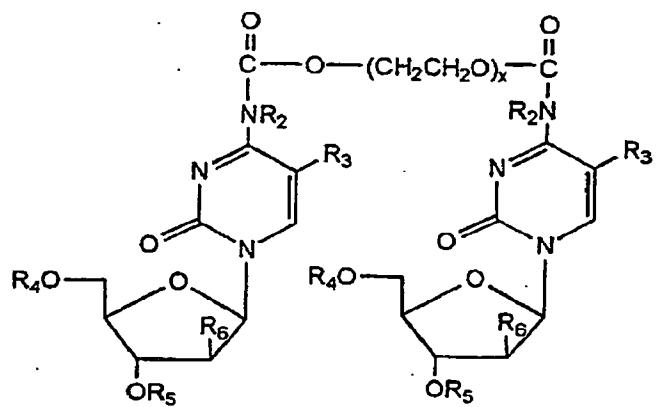
B部分、即ち、ara-C誘導体は、カップリング剤の存在下で結合させることもできる。適するカップリング剤の非限定的な例としては、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)、任意の適するジアルキルカルボジイミド、2-ハロ-1-アルキル-ビリジニウムハライド、(Mukaiyama試薬)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド(EDC)、1-ブロパンホスホン酸環状無水物(PPACA)、及びフェニルジクロロホスフェート等を挙げることができ、これらは、例えば、Sigma-Aldrich Chemical等の商業的製造元から入手したものを利用できるか、又は公知技術により製造することができる。好ましくは、EDCをピリジン中で用いて、ara-C誘導体をPEG-カルボン酸と結合させる。あるいは、PEG-カルボン酸活性化イミド、T-PEG、をピリジン中でara-Cと反応させて所望のコンジュゲート(プロドラッグ)を生成させる。別の不活性溶媒、例えば、塩化メチレン、クロロホルム

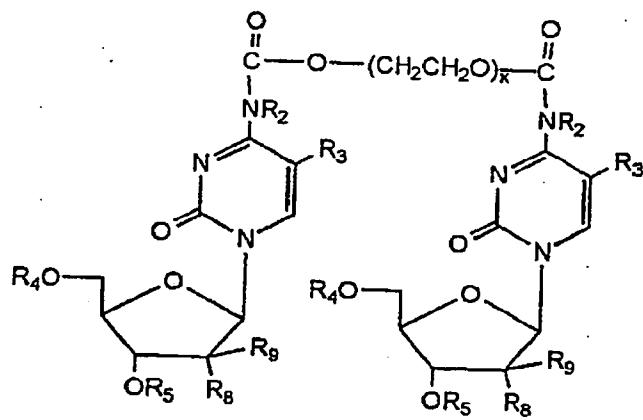
、トルエン、DMF、又はそれらの混合物等も使用することができる。また、反応は、好ましくは20℃～約45℃の温度で、4-(ジメチルアミノ)ピリジン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、トリエチルアミン等の塩基の存在下に実施して、生成する酸を中和する。選択した合成方法によらず、本明細書に開示された合成技術により得られる好ましい化合物の幾つかを例示すると以下の通りである。

【0027】

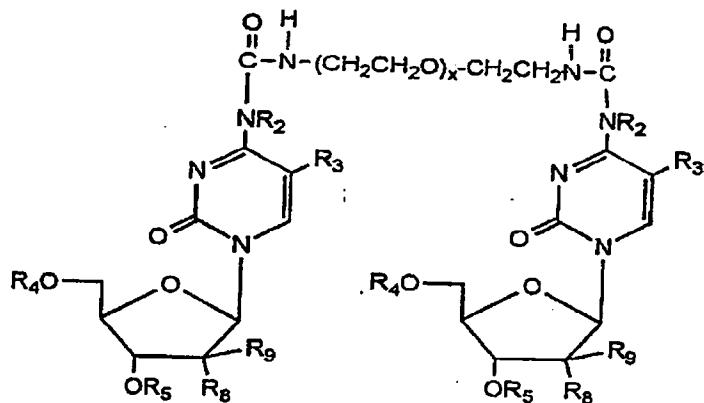
【化17】







および



上記式中、xは重合度を表す。

【 0 0 2 8 】

E. 治療方法

本発明の別の態様に於いて、哺乳動物の様々な医学的状態を治療する方法が提供される。該方法は、その様な治療が必要な哺乳動物に有効量のポリマーコンジュゲート、例えば本明細書に記載された方法に準じて製造された a r a - C - P E G コンジュゲートを投与することを含んで成る。該化合物は、とりわけ、哺乳動物における、白血病等の新生物疾患の治療、腫瘍量(tumor burden)の低減、新生物転移の予防、及び腫瘍／新生物の成長の再発の予防に有用である。

【 0 0 2 9 】

本発明のポリマーコンジュゲートの投与量は、該コンジュゲートに実際に含まれる a r a - C 分子に依存する。一般に、上記治療方法で使用するプロドラッグ

の量は、哺乳動物において所望の治療結果を効果的に達成する量である。当然、種々のプロドラッグ化合物の投与量は、親化合物、*in vivo*での加水分解速度、ポリマーの分子量等に多少依存して変動する。しかしながら、プロドラッグ *ara*-C は、一般に、*ara*-C 部分の量に基づいて 1 日当たり約 5 ~ 約 5,000 mg/m² の量で投与する。同様に、ゲムシタビンポリマーコンジュゲートプロドラッグは、1 日当たり約 5 ~ 約 2,000 mg/m² の量で投与する。前記した投与量の範囲は例示であって、当業者は、臨床経験や治療適応症に基づいて、選択したプロドラッグの最適投与量を決定する。実際の投与量は、過度の実験をしなくても当業者には自明である。

〔 0 0 3 0 〕

本発明のプロドラッグは、哺乳動物へ投与するための 1 種又はそれ以上の適する医薬組成物に含ませることができる。本発明の医薬組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、カプセル等の形態であり得、それらは、当業者に公知の方法で製造される。その様な組成物は、当業者のニーズに応じて経口的又は非経口的に投与され得る。例えば、本発明の組成物の溶液及び/又は懸濁液は、公知の方法、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射等による本発明の組成物の注射又は浸潤の為の担体ビヒクルとして用いてもよい。

〔 0 0 3 1 〕

上記投与は、体内空間 (body space) 又は体腔への注入によってもよく、また、吸入及び/又は鼻腔内経路によってもよい。しかしながら、本発明の好ましい態様では、プロドラッグはそれを必要とする哺乳動物に非経口的に投与される。

〔 0 0 3 2 〕

F. 実施例

以下に示す実施例は本発明を更に理解する一助となるために記載されているが、本発明の有効な範囲を決して制限するものではない。実施例の中で下線を引いた数字及び肉太活字の数字は、添付図に示されている数字に対応している。

〔 0 0 3 3 〕

全ての反応は、乾燥した窒素又はアルゴン雰囲気下で実施した。市販されている試薬は更に精製することなく使用した。*ara*-C は Sigma Chemical Compoun

d (Madison, WI) から入手し、t-Bocで保護したアミノ酸はAdvanced ChemTech (Louisville, KY) から入手した。全てのPEG化合物は、その使用に先立ち、減圧下で、又はトルエンからの共沸蒸留により脱水した。

【 0 0 3 4 】

H P L C 法

HPLC分析は、移動相としてメタノール-水の80:20混合物(v/v)を用いるアイソクラチック条件下、C8逆相カラム(Beckman, ultrasphere)を用いて実施した。ピーク溶出は、紫外吸光検出器を用いて254nmでモニタリングした。遊離PEGの存在を検出し、そしてPEG化生成物の存在を確認するために、蒸発光散乱検出器(ELSD) PL-EMD 950型(Polymer Laboratories)を使用した。ELSD/紫外線分析に基づくHPLCにより、全ての最終的なPEG化生成物が原料のara-Cを含まず、95%以上の純度を有することが示された。

【 0 0 3 5 】

PEG誘導体中のara-C含有量の分析

ara-Cがアシル化されると吸光度が変化するので、PEG誘導体中のara-C含有量の測定は、N⁴-アセチルシチジンを標準として用いて行った。水中のN⁴-アセチルシチジンの紫外線吸光度は、0.01μmole/mL～0.05μmole/mLの範囲の6種の異なる濃度について、257nmで測定した。濃度に対する吸光度の標準プロットから、N⁴-アセチルシチジンの吸収係数εを計算すると、36.4(O.D. 257nm, 1mg/mL, 光路1.0cm)であった。PEG化ara-C誘導体を約0.015mmole/mL(40kDaの分子量に基づく)の濃度で水に溶かし、これら化合物の紫外線吸光度を257nmで測定した。この値及び上記で得られた吸光係数εを用いて、サンプル中のara-Cの濃度を測定した。この値をサンプルの濃度で割って、サンプル中のara-Cの濃度(%)を得た。

【 0 0 3 6 】

実施例1 PEG-アミド-ara-C (3)

無水ピリジン(10mL)にara-C(1, 20mg, 0.082mmole)

) 及び T - P E G (2, 40 kDa, 0.5 g, 0.013 mmol) を加えた混合物を 40 ℃ で一晩攪拌した。反応混合物を減圧下に濃縮し、残渣を 2 - プロパンノール (I P A, 100 mL) から再結晶させて、0.48 g (96 %) の生成物を白色固体として得た。紫外線分析で測定したこの化合物中の a r a - C の量は 1.07 重量 % であった。

【 0 0 3 7 】

¹³ C N M R (67.80 M H z, C D C I₃) δ 61.06, 69.77 ~ 70.74 (P E G), 74.36, 85.21, 87.30, 94.63, 146.35, 153.58, 161.35, 169.23.

【 0 0 3 8 】

実施例 2 P E G - カルバメート - a r a - C (5)

D C M (10 mL) 及び D M F (10 mL) に S C - P E G 40 kDa (4, 1.0 g, 0.025 mmol) 及び 1 (0.15 g, 0.5 mmol) を加えた混合物に、D I E A (60 μL, 0.35 mmol) を添加し、得られた混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下に除去し、残渣を I P A から再結晶させて、P E G - カルバメート - a r a - C (5) を得た。

【 0 0 3 9 】

実施例 3 P E G - 尿素 - a r a - C (8)

80 mL のトルエンに P E G - ジアミンジヒドロクロリド (6) (3.0 g, 0.08 mmol) を溶かした溶液を、2 時間共沸させた。溶液を 30 ℃ に冷却した後、トリホスゲン (0.02 g, 0.06 mmol) 及び D I E A (0.07 g, 0.5 mmol) を添加した。この混合物を 70 ~ 80 ℃ で 3 時間攪拌した後、室温に冷却し、60 mL のエチルエーテルを添加した。窒素下での濾過により P E G - イソシアネート (7) を収集し、直ぐに、無水ビリジン (30 mL) に 1 (0.27 g, 1.1 mmol) 及び D M A P (0.14 g, 1.1 mmol) を溶かした溶液に添加した。反応液を 45 ℃ で一晩攪拌した。溶媒を減圧下に除去し、残渣を I P A から結晶させて P E G - 尿素 - a r a - C (8) を得た。

【 0 0 4 0 】

実施例 4 P E G - アミド - ゲムシタピン (10)

無水ピリジン (50 mL) にゲムシタビン (9, 261 mg, 0.99 mmol) 及び 2 (40 kDa, 5 g, 0.13 mmol) を加えた混合物を 40°C で一晩攪拌した。反応混合物を減圧下に濃縮し、残渣を IPA (400 mL) から再結晶させて、4.8 g (96%) の生成物を白色固体として得た。ara-C の分析と同様の紫外線分析で測定したこの化合物中のゲムシタビンの量は 0.93 重量% であった。

【 0041 】

¹³C NMR (67.80 MHz, CDCl₃) δ 58.62, 67.73, 68.23, 69.91 ~ 70.84 (PEG), 71.93, 78.36, 81.00, 95.79, 122.04, 144.66, 154.34, 161.22, 169.59。

【 0042 】

実施例 5 インビボ実験

ドナーマウスから採った LX-1 の 4 ~ 5 mm³ 組織フラグメントを無胸腺ヌードマウスの皮下に移植した。腫瘍のトロカール部位を 1 週間に 2 度観察し、1 度触診した。各マウスにつき、2 つの寸法をカリパスで測定し、式：

$$\text{腫瘍容積} = (\text{長さ} \times \text{幅}^2) / 2$$

を用いて計算して、腫瘍容積を求めた。腫瘍の平均容積が 300 mm³ に達したとき、マウスを、未処理対照群、未修飾 ara-C 群、及び PEG-ara-C 群から成る実験群に分けた。マウスを、腫瘍の大きさについて均一に成るように分類して、各群当たり 6 ~ 7 匹となるようにした。永久的識別のため、マウスの耳に穴をあけた。尾の静脈から薬剤を 3 日毎 × 4 用量（第 1 日、第 4 日、第 7 日及び第 10 日）で、1 分当たり約 0.5 mL の速度で静脈内投与した。容積に制限があるため、ara-C とそのコンジュゲート誘導体は等しいモル量基準（活性成分の絶対量）では投与できなかった。代わりに、PEG-コンジュゲートは個々の用量 20 mg / kg で投与し、親化合物は最大耐用量 (MTD) に近い量である 1 回用量当たり 100 mg / kg で投与した。従って、本研究では、PEG-コンジュゲートは本来の用量の 1 / 5 の量で比較しており、この量は PEG-コンジュゲートの MTD より極めて少ない量であると推定される。マウスの体

重と腫瘍の大きさを、研究の開始時及び1週間に2度ずつ4週間にわたり測定した。薬剤の効果は、処理したマウスと未処理（ビヒクル無し）の対照マウスにおける腫瘍の成長を比較することで測定した。比較のために以下に示す5種類の終点を採用した。（a）第24日目の平均腫瘍容積；（b）個々の腫瘍の容積についての、最初の容積からの平均変化（%）；（c）対照群の腫瘍容積の中央値が約 $800 \sim 1100 \text{ mm}^3$ （指數的増殖期）に達したときに測定した腫瘍容積の差（%T/C）；（d）第24日目の腫瘍容積の差（%T/C）；及び（e）各群あたりの腫瘍の退縮（第1日目と比較して第24日目に小さくなった腫瘍容積）の数。

【 0 0 4 3 】

結果

本来のara-Cは、この固形腫瘍モデルでは効果が無いようであった。それに対して、未修飾群の用量の1/5、即ち、本来の用量の1/5の用量で、PEG-ara-Cは腫瘍の成長を有意に阻害した（表1）。PEG-ara-Cでの処理により、対照群及び本来のara-C群と比較して、平均腫瘍容積が小さくなり、腫瘍寸法の増大の程度が小さくなり、腫瘍がより退縮した。

【 0 0 4 4 】

【表1】

表 1. ネードマウスの皮下ヒト非小細胞性肺癌^β (LX-1) に対する ara-C と PEG-ara-C^αの効果の比較

	総用量 (mg/kg)	第24日目 の平均容積 ± SEM	第24日目 の変化 (%) ± SEM	第7日目 のT/C (%) ^δ	第24日目		完全退縮 (頭数/群) (頭数/群)
					のT/C (%) ^δ	の退縮 (頭数/群)	
対照	0	3131.8 ± 258.7	1035.8 ± 258.7	—	—	—	0/7
ara-C	400	3192.5 ± 369.1	1514.8 ± 369.1	112.2	144.6	0/7	0/7
PEG-ara-C	80	2205.0 ± 202.9	557.4 ± 202.9*	76.4	73.0	1/6	1/6

α 全てのPEG化合物は静脈注射により1週間当たり2回で2週間投与した。

β 肿瘍の平均基準容積は300mm³であった。

δ 対照群の腫瘍容積の中央値が約1000mm³(第7日)及び約2400mm³(第24日)に達したとき、
処理群と対照群の腫瘍容積の中央値を測定し、比較した。

* ara-C に対して有意 (P<0.05)

実施例 6 in vitro実験

細胞系及び細胞傷害性アッセイ。IC₅₀。(細胞の増殖を50%抑制するのに

必要な薬剤の濃度)を求めるためのP388/0細胞系を使用する研究を維持し、標準的手順により実施した。手短かに述べれば、IC₅₀を求めるために、マイクロウェルプレートにウェル当たり2×10³細胞/50μLの密度で細胞を播種した。プレートを、CO₂濃度5%の加湿インキュベーター内で37℃で3日間インキュベートした。ウェル当たり10μLのAlamar Blue (Alamar Biosciences, Inc., Sacramento, CA) を添加して細胞の増殖を測定し、プレートを37℃で更に4日間インキュベートした。各化合物のIC₅₀値は、希釈率に対して吸光度をプロットして求めた。動物移植用の全ての細胞培養物を、5%CO₂/95%O₂の湿潤雰囲気下37℃で保持し、1週間に1度の割合で継代培養した。全ての細胞系をマイコプラズマ (Mycoplasma) に対して定期的に試験したが、全てマイコプラズマ (Mycoplasma) を含んでいなかった。結果を表2に示す。

【0045】

【表2】

表2. ara-C、ゲムシタビン及びそれらのPEG誘導体のin vitroの結果

化合物	IC ₅₀ (P388/0, nM)
ara-C	10
PEG-ara-C	12
ゲムシタビン	2
PEG-ゲムシタビン	46

本発明の好ましい実施形態であると現在のところ考えられる態様について説明したが、本発明の精神から逸脱することなく変更や修正ができるることは当業者には理解されるであろう。その様な全ての変更及び修正が本発明の真の範囲に入るるものとして特許請求するものである。本明細書の中で多数の参照文献を引用したが、それら全ての参照文献の開示内容は参照により全て本明細書に組み入れる。

【図面の簡単な説明】

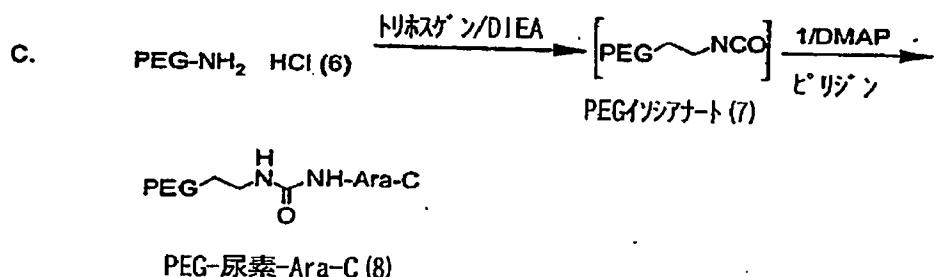
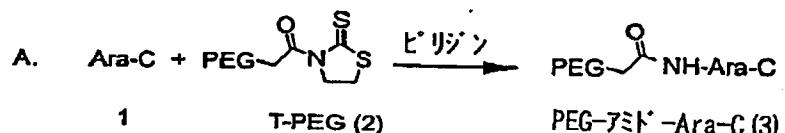
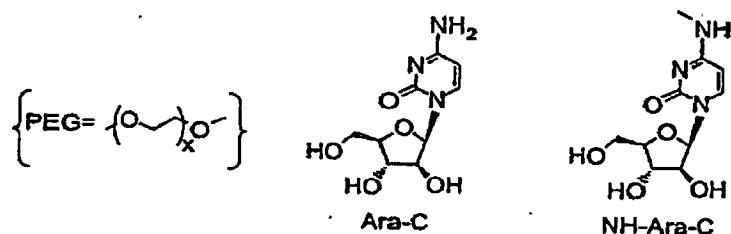
【図1】

図 1 は、本明細書中に記載されている化合物の合成を概略的に説明する図である。

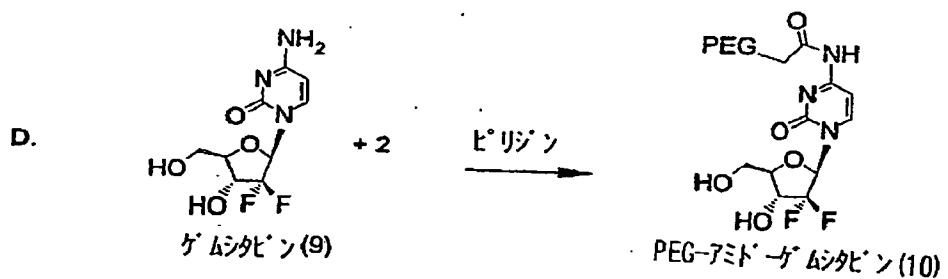
【図 2】

図 2 は、本明細書中に記載されている化合物の合成を概略的に説明する図である。

【図 1】



【図 2】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/25895
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) :Please See Extra Sheet. US CL :Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 550/27.4 514/44		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST online STN online CAS online		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,880,131 A (GREENWALD et al) 09 March 1999, cols. 21 through col 24, line 11, claims 1-36.	1-20
Y	BALAJTHY et al. Synthesis and Functional Evaluation of a Peptide Derivative of 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine. Journal of Medicinal Chemistry. 1992, Vol. 35, No. 18, page 3344-3349, entire document.	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 06 NOVEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 23 MAR 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3280		Authorized officer  JAMES D. WILSON Telephone No. (703) 308-1235

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US00/25895

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7): A01N 49/04; A61K 31/70

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL : 536/27.4; 514/44

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷
// A 61 K 31/7084

識別記号

F 1
A 61 K 31/7084

テマコード(参考)

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

F ターム(参考) 4C076 BB01 BB13 BB15 BB16 CC27
CC42 EE23Q FF63 FF67
GG50
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 FA06
MA01 MA04 NA15 ZB26 ZB27
4J005 AA04 BD02 BD05

【要約の続き】

